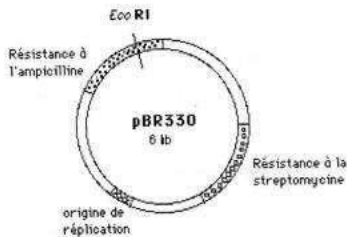


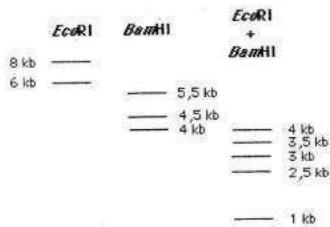
Epreuve de Génétique microbienne et Génie Génétique

- I. Quel avantage majeur fournit le clonage de gènes de mammifères dans un système procaryote, à partir d'ARNm ou de gènes synthétiques par rapport à l'amplification par PCR ou au clonage de gènes natifs ?
- II. Décrire les éléments d'un vecteur d'expression permettant d'avoir la transcription d'un gène cloné.
- III. On souhaite cloner un fragment d'ADN de *Drosophila melanogaster* dans le plasmide pBR330, dont la carte est donnée ci-après.



Les produits de ligation vont ensuite transformer une souche d'*E.coli*.

1. Proposez un protocole de clonage et indiquez comment vous sélectionnez les clones ayant incorporé un plasmide, ceux qui ont incorporé un plasmide recombinant. Comment expliquer la présence de colonies résistantes aux deux antibiotiques ?
2. Un des plasmides recombinants contenant l'insert est digéré par les enzymes de restriction *Bam* HI et *Eco* RI. Après migration et séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose, on obtient les profils de restriction suivants :



**CONCOURS D'ACCÈS EN 1^{ère} ANNEE POST-GRADUATION
MICROBIOLOGIE APPLIQUEE AUX SUBSTANCES
ANTIMICRORIENNES**

**ÉPREUVE DE TECHNIQUES D'ANALYSES BIOLOGIQUES
(DURÉE 1H30).**

Les défensines constituent une famille de peptides antimicrobiens naturels largement impliqués dans l'immunité non spécifique, ou innée. Une nouvelle défensine (stable entre pH 4 et 8) a été identifiée dans des leucocytes bovins.

1. Afin d'extraire cette défensine, vous rapportez 20kg de rates de bœufs d'un abattoir. Pourquoi utilisez-vous des rates de bœufs et en si grande quantité?
2. Quelles sont les deux premières techniques à effectuer pour obtenir un extrait riche en défensine (ED)? Expliquer brièvement.
3. Sachant que vous devez utiliser du tampon phosphate salé (PBS) composé de 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , quels seraient le pH et la concentration du PBS ? Comment le préparer ?
($\text{pK}_a : 6,5 / \text{Na} : 23 \text{ g.mol}^{-1} / \text{Cl} : 35,45 \text{ g.mol}^{-1} / \text{K} : 39 \text{ g.mol}^{-1} / \text{P} : 31 \text{ g.mol}^{-1}$)
4. Vous ajoutez à ED du sulfate d'ammonium à une concentration donnée. Vous centrifugez la solution, récupérez le surnageant et jetez le culot. Vous ajoutez plus de sulfate d'ammonium au surnageant. Vous centrifugez à nouveau l'échantillon mais cette fois-ci vous conservez le culot qui contient la molécule d'intérêt.
 - 4.1. Pourquoi faire deux étapes d'addition de sel?
5. Vous solubilisez le culot obtenu précédemment et vous le dialysez durant la nuit contre un grand volume de tampon.
 - 5.1. Pourquoi le sulfate d'ammonium n'est-il pas inclut dans le tampon de dialyse?
 - 5.2. Pourquoi utiliser un tampon plutôt que de l'eau?
 - 5.3. Quel doit être le pH de ce tampon ?
6. Vous injectez l'échantillon dialysé sur une colonne de Sephadex G-50 (1500-30000). Vous collectez la première fraction qui sort de la colonne et jetez les fractions suivantes sortant ultérieurement de la colonne.
 - 6.1. Quelle information vous apporte cette étape ?
7. Vous injectez la fraction collectée, resuspendue dans du tampon acétate pH3, sur une colonne de SP-Cellulose.
 - 7.1. De quel type de chromatographie s'agit-il ?
 - 7.2. L'élution est réalisée par un gradient linéaire de pH, comment doit être ce gradient ? Donnez une autre méthode d'élution.
 - 7.3. Les fractions récoltées ne présentent aucune activité antimicrobienne, pourquoi ?
 - 7.4. Que suggérez-vous afin que l'activité soit détectée ?

8. Vous utilisez un petit échantillon de votre fraction active, qui est maintenant très réduit en volume et clair, sur un gel d'isoélectrofocalisation. Après coloration, vous observez trois bandes étroites. Vous conservez la bande de pI 5.6. Mais vous décidez de réaliser une expérience supplémentaire pour vérifier la pureté de la molécule. Vous découpez la bande de pI 5.6 et faites migrer un échantillon sur une SDS-PAGE en présence de DTT, trois bandes sont observées.

8.1. Pourquoi n'étiez-vous pas convaincu de la pureté de la bande unique sur l'IEF?

8.2. Quel résultat vous apporte la SDS-PAGE?

8.3. Comment confirmer la pureté de la défensine ?

8.4. Pourquoi est-il important de faire la SDS-PAGE après l'IEF?

Bon courage.